

〈2014 年度 バイオ環境研究科〉 博士学位論文の要旨及び審査の結果

氏 名	熊田 アンリ オバディア (くまだ あんり おばでいあ)
学位の種類・番号	博士 (バイオ環境) ・乙 (論文博士) 第 1 号
学位授与年月日	2 0 1 5 年 3 月 1 6 日
博士論文題目	Studies on development of the sensitive HTLV-I protease Inhibition assay and synthesis of the novel protease Inhibitors (ヒトT細胞白血病ウイルス-I型 (HTLV-I) プロテアーゼの高感度阻害活性測定法の開発と新規プロテアーゼ阻害剤の合成に関する研究)

〈審査委員〉

主調査委員	關谷 次郎
副調査委員	深見 治一 中村 正彦
試問委員	松原 守 坂本 文夫

論文の要旨

本論文は、成人 T 細胞白血病 (ATL) の因子となるヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) が産生するプロテアーゼの高感度な活性測定法を確立し、これを用いて本プロテアーゼの新規な阻害剤をデザイン・合成・評価した結果を取りまとめたものであり、以下の内容から構成されている。

イントロダクションでは、HTLV-I が引き起こす ATL についての病態、地域性、治療法の現況などについての文献調査がまとめられており、いまだに有効な治療法がないことが述べられている。次いでレトロウイルスの一種である HTLV-I の増殖、ゲノム構成、翻訳・翻訳後修飾、翻訳後修飾における HTLV-I プロテアーゼの重要性などについて記述されている。そこで本研究の目的として、治療薬創製のための基礎研究として HTLV-I プロテアーゼの高感度な活性測定法の確立と強力な阻害剤の開発を取りあげた。

第 1 章では、HTLV-I プロテアーゼに関するこれまでの知見に基づいて、遺伝子組み替えプロテアーゼ調製法と蛍光基質の開発について検討し、高感度な酵素活性測定法の確立について述べている。ネイティブな HTLV-I プロテアーゼは不安定であったが、今回調製に成功した組換え [L40I] HTLV-I プロテアーゼは安定性が高く、大量調製も可能である。またこれまで発色基質が用いられていたが、感度が低かった。そこで新規な蛍光基質を合成した。これらを組合わせて高感度で迅速に測定できる HTLV-I プロテアーゼの活性測定法を確立した。

第 2 章では、第 1 章で確立された HTLV-I プロテアーゼ活性測定法を用いて、阻害剤の開発を行っている。HTLV-I プロテアーゼは 1 分子鎖あたり 125 残基からなる C2 対称ホモ二量体と考えられている。両方のサブユニットで構成されるフラップ領域と中央の触媒活性部位に挟まれて形成される空間に基質 (前駆体タンパク質や蛍光基質) が入り込み、酵素の複数のサブサイトと基質の側鎖間で水素結合などの相互作用が起こり、また触媒活性部位にて酵素-基質遷移状態を形成する。次いで基質はペプチドに切断される。本章で開発を目指す阻害剤は、基質と拮抗してプロテアーゼのサブサイトと触媒活性部位に入り込み、反応を拮抗阻害するものである。報告されている [L40I] HTLV-I プロテアーゼと阻害剤から成る複合体の X 線結晶構造解析の結果を参考にして、Molecular Operating Environment 2009.1001 (MOE) を用いてのモデリングを行いながら親水性を高め分子サイズを縮小した化合物をデザインし、合成した。新規 HTLV-I プロテアーゼ活性測定法で阻害活性を評価した結果、IC₅₀ 値が 15 nM 以下の阻害剤の取得に成功した。

第 3 章では、第 2 章で得られた阻害剤 (KNI-10635) をリード化合物として、

分子サイズのさらなる縮小と阻害活性の向上を目指して、この化合物の側鎖 **P₃-cap** 部分をもたない化合物の創製を試みている。前章と同様に **MOE** を用いてモデリングしながら、最適と考えられる阻害剤をデザイン・合成した。これらの阻害剤候補化合物の阻害活性を新規プロテアーゼ活性測定法で評価したところ、有力な阻害剤(**KNI-10842**、**IC₅₀ = 6.1 nM**)を見出した。本阻害剤は、これまで知られている **HTLV-I** プロテアーゼのペプチドタイプ阻害剤の中で最も分子サイズが小さく、最も強力な阻害剤であった。

今後の展望では、本研究によって確立された高感度な **HTLV-I** プロテアーゼ活性測定法あるいは創製された阻害剤をベースにさらに多くの阻害剤が開発されるであろう。そして有望な阻害剤はさらに細胞レベル、個体レベルで検討されることによって、**HTLV-I** の増殖抑制や **ATL** の治療薬創製につながることを期待すると述べている。

審査の結果

本論文は、**ATL** の因子となる **HTLV-I** の産生するプロテアーゼの高感度な活性測定法を確立し、これを用いて本プロテアーゼの新規な阻害剤を合成した結果を取りまとめたものであり、以下の点が評価される。

HTLV-I が引き起こす **ATL** についての有効な治療薬はいまだ開発されていないが、その治療薬開発のターゲットとして **HTLV-I** プロテアーゼが取りあげられている。しかし細胞から抽出・精製した **HTLV-I** プロテアーゼは不安定で、また活性測定に時間がかかる点が難点であった。

第 1 章で、**HTLV-I** プロテアーゼの 1 アミノ酸置換によって安定性の高い組換え [**L40I**] **HTLV-I** プロテアーゼを取得することに成功した。また活性測定の感度を上げるために有効な蛍光基質を合成することにも成功している。これらを組み合わせて使用することで、迅速かつ高感度な **HTLV-I** プロテアーゼ活性測定法を確立することができた。これを活用することによって **HTLV-I** プロテアーゼの阻害剤の開発研究を飛躍的に進展させることが期待される。

第 2 章、第 3 章では、第 1 章で確立した **HTLV-I** プロテアーゼ活性測定法を用いて、阻害剤の開発をおこなった結果を述べている。本章で開発をめざす阻害剤は、基質と拮抗してプロテアーゼのサブサイトと触媒活性部位に入り込み、反応を拮抗阻害するタイプのものである。そこで報告されていた [**L40I**] **HTLV-I** プロテアーゼと阻害剤の複合体の X 線結晶構造解析の結果を参考にして **MOE** を用いてモデリングを行いながら、親水性を高め分子サイズを縮小した化合物をデザイン・合成した。新規 **HTLV-I** プロテアーゼ活性測定法を用いて阻害活性を評価したところ、**IC₅₀** 値が **10 nM** 以下の阻害剤の取得に成功した。中でも **KNI-10842** は **IC₅₀ = 6.1 nM** と低く、分子サイズも小さく強力な阻害剤である。

このように、本研究は、**ATL** の原因ウイルスである **HTLV-I** の治療薬開発のターゲットの一つである **HTLV-I** プロテアーゼ阻害剤研究に必要な高感度プロテアーゼ活性測定法を提供した。またこの酵素活性測定法を用いることによって、新規で強力な **HTLV-I** プロテアーゼ阻害剤開発の可能性が示され、**HTLV-I** プロテアーゼ阻害剤の今後の開発研究に貢献することが期待される。

本論文は、**HTLV-I** プロテアーゼの高感度活性測定法の確立および **HTLV-I** プロテアーゼの新規かつ強力な阻害剤の開発等、学術および産業上、また健康な社会作りに寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（バイオ環境）の学位論文として価値あるものと認める。なお平成 27 年 2 月 19 日公聴会で論文内容とそれに関連した事項について試問した結果、博士の学位取得の基準を満たしていることを確認した。また専攻学術（分子生物学、生化学、細胞生物学、生物有機化学、植物生理生化学）および英語について学識確認を行った結果、本学大学院博士課程後期を修了した者と同等以上の学力を有すると判定した。